第2卷第4期增刊　　动物学研究　　Vol.2, No. 4
1981年11月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Nov., 1981

福建产圆斑蝰蛇(*Vipera russelli siamensis*)蛇毒毒性磷酯酶A_2的氨基酸组成和N-末端部分氨基酸顺序的测定

涂光俸　冉永禄
(中国科学院昆明动物研究所)

张耀时　陈远聪
(中国科学院上海生物化学研究所)

刘广芬
(福建医科大学药理教研组)

摘　要

福建产圆斑蝰蛇毒毒性磷酯酶A_2分子由18种氨基酸的124个残基组成，由此计算它们的分子量为13,883。分子中天门冬氨酸、甘氨酸、酪氨酸和半胱氨酸残基的含量较高，但只含有一个甲硫氨酸和一个色氨酸残基。

用手工Edman降解方法测出毒性磷酯酶A_2的氨基端部分氨基酸顺序为：

Asn(1)-Leu-Phe-Gln-Phe(5)-Ala-Arg-Met-ILe-Asn(10)-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala(15)-Phe-(-)-Phe-(-)-Asn(20)-Tyr-Ile。

由于磷酯酶A_2多种多样的药理作用，关于它的结构与功能关系的研究，愈来愈引起人们的重视，迄今已有二、三十种蛇毒磷酯酶A_2的一级结构得到完满的解决。

关于圆斑蝰蛇毒磷酯酶A_2的结构研究还未见报道。前文[1]报导了从福建产圆斑蝰蛇毒中纯化了一个毒性磷酯酶A_2，并测定了它们的某些理化性质，本文报导了该酶的氨基酸组成及氨基端部分氨基酸的排列顺序。

方法和结果

一、氨基酸组成

称取蝰蛇毒毒性磷酯酶$A_2$0.3毫克，溶于含4%巯基乙酸的5.7N HCl 0.5毫升中，真空封闭，110°C水解24小时。另取同样量的样品经过甲酸氧化后，加5.7N HCl真

空封闭，110°C水解24小时，开管后，真空蒸去盐酸，分别用Hitachi 835型氨基酸自动分析仪定量测定。色氨酸的量以加巯基乙酸水解测得值为准，磺基丙氨酸以过甲酸水解为准。从SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定的分子量与测得的氨基酸组成值求得相应的倍数，换算成相对的分子比。结果如表1所示。

表1 圆斑蝰蛇毒磷酯酶A₂的氨基酸组成

Ala	7	Lys	6
Arg	6	Met	1
Asp	17	Phe	7
CySH	12	Pro	1
Glu	10	Ser	7
Gly	14	Thr	4
His	2	Trp	1
Ile	5	Tyr	9
Leu	6	Val	5
Total	124	M.W.	1388[illegible]

二、氨基端部分氨基酸顺序

1.手工Edman顺序测定

基本上按照Edman和 Peterson 等人[3]的改进方法，在一只带有磨口玻塞的10毫升玻璃离心管中，将3毫克圆斑蝰蛇毒磷酯酶A_2样品溶于0.4毫升、0.4MpH9.5二甲基烯丙基胺（DMAA）缓冲液中，加入60微升异硫氰酸苯酯（PITC）通入氮气后摇匀，在50°C反应半小时，用苯（4×1.5毫升）将过量试剂抽出，水相在55°C用氮气吹干，加入0.5毫升无水三氟乙酸，在50°C裂解10分钟，在氮气流下将三氟乙酸吹干后，加入0.4毫升水、1毫升乙酸乙酯，摇匀后离心分相，抽出有机相后，再加入2×1毫升乙酸乙酯，如此抽提共三次。在水相中含有除去N端氨基酸残基的肽段，在55°C用氮气吹干后，可开始下一步Edman降解。有机相中含有产物苯胺基噻唑啉酮氨基酸（ATZ-氨基酸），在氮气流中将有机相吹干，加入0.5毫升1N盐酸，在80°C保温10分钟，此时ATZ-氨基酸转化成苯基乙内酰硫脲衍生物（PTH-氨基酸），用乙酸乙酯抽提，除了PTH-精氨酸、组氨酸及半胱磺酸仍留在水相外，其他PTH-氨基酸都进入有机相，分别将有机相和水相用氮气吹干后，用硅胶薄板（E.Merck产品，5554型，硅胶$60F_{254}$）鉴定PTH-氨基酸。

2.PTH-氨基酸的鉴定

从有机相所得的PTH-氨基酸，加一滴乙酸乙酯溶解后在硅胶薄板上点样，用溶剂系统1（氯仿：乙醇=98：2）展层后在254毫微米紫外灯下可鉴定PTH-脯氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、色氨酸、甘氨酸、酪氨酸、赖氨酸及双—PTH-胱氨酸。用溶剂系统2（氯仿：乙醇：甲醇=88.2:1.8：10）可鉴定PTH-苏氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、门冬酰胺、谷氨酸及门冬氨酸。从水相所得的PTH-氨基酸，用丙酮（含1%水）溶解后，点样于硅胶薄板上，用溶剂系统3（乙酸丁酯:异丙醇：吡啶：乙酸：水=10：4：4：1：1）展层后用碘蒸气熏，产生黄色斑点，可鉴定PTH-组氨酸、精氨酸及半胱磺酸。在鉴定胱氨酸时，前半个胱氨酸分子经降解后，通过它的二硫键仍与后半个分子相连接，所以在测定前半个胱氨酸分子时，在顺序上会出现一个空缺，当测定到后半个胱氨酸分子时，经Edman降解后可形成双—PTH-胱氨酸。测得的氨基端部分氨基酸顺序如表2所示，为了比较起见，表2还列出了猪胰和其它蛇毒的磷酯酶A以及具有毒性的磷酯酶A_2的氨基端氨基酸排列次序。

表2　几种磷酯酶和毒素的氨基末端顺序的比较

酶或毒素的来原	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1.圆斑蝰蛇	Asn	Leu	Phe	Gln	Phe	Ala	Arg	Met	Ile	Asn	Lys	Lys	Leu	Gly	Ala	Phe	(-)	Phe	(-)	Asn	Tyr	Ile
2.沙蝰（毒性磷酯酶A₂）	Asn	Leu	Phe	Gln	Phe	Ala	(-)	Met	Ile	Asn	Asn	(-)	Arg	Leu	(-)	Ala	Phe	Arg	Val	Gly	(-)	Tyr
3.沙蝰（毒性成分）	Asn	Leu	Phe	Gln	Phe	Ala	Asp	Met	Ile	Leu	Gln	His	Leu	Gly	Lys	Phe	Ala	Val	---			
4.虎蛇毒素	Asn	Leu	Val	Gln	Phe	Ser	Tyr	Leu	Ile	Glu	Cys	Ala	Asn	His	Gly	Lys	Arg	Pro	Thr	Trp	His	Tyr
5.广东金环蛇毒神经毒	Asn	Leu	Tyr	Gln	Phe	Lys	Asn	Met	Ile	Glu	Cys	Ala	Gly	Thr	Arg	Thr	Gly	Ile	Ala	Tyr	Val	Lys
6.台湾金环蛇毒神经毒	Asn	Leu	Tyr	Gln	Phe	Lys	Asn	Met	Ile	Glu	Cys	Ala	Gly	Thr	Arg	Asn	Ile	Ala	Gly	Phe	Thr	Asn
7.猪胰磷酯酶A₂	Ala	Leu	Trp	Gln	Phe	Arg	Ser	Met	Ile	Lys	Cys	Ala	Ile	Pro	Gly	Ser	His	Pro	Leu	Met	Asp	Phe

（1）本文报告　（2）Tchorbanov, B. et al.,(1978), Toxicon 16, 37,　（3）Aleksiev, B. and Shipolini, R. (1973), International symposium on polymers, Varna(Bulgaria) Vol.1, 417.（4）Eaker D. (1975), Toxicon, 13, 90, (5)Zhang, Y.S.et al., (1981) unpublished, (6)Hsieng-sen Lu and Tung-bin Lo(1978) Int.J.Peptide Protein Res. 12, 181, (7)De haas, G. H. et al., (1970) Biochim. biophys. Acta 221, 31.

表中符号（一）代表尚未完全确证的氨基酸残基。

讨　　论

从已经测定的磷酯酶A₂的氨基酸组成来看，它们都具有一些共同的特征，即高含量的门冬氨酸，半胱氨酸，甘氨酸和酪氨酸，但甲硫氨酸和色氨酸的含量却较低。福建产圆斑蝰蛇毒毒性磷酯酶A₂的氨基酸组成也具有这些特征。它含有17个门冬氨酸，12个半胱氨酸、14个甘氨酸和9个酪氨酸残基，但只含有1个甲硫氨酸和色氨酸残基。

由表2可以看出，福建产圆斑蝰蛇毒毒性磷酯酶A₂和其它来源的磷酯酶A₂以及具有磷酯酶A₂活性的毒素的N端氨基酸顺序中，Asn—Leu、Gln—Phe、Met—Ile的顺序

是相同的。至于圆斑蝰蛇毒和沙蝰蛇毒磷酯酶A₂之间的共同之处就更多了。

参 考 文 献

1 冉永禄等，福建产圆斑蝰蛇蛇毒磷酯酶A的分离纯化及部分性质研究．动物学研究 1981年 2，4（增刊）3页．

2 Edman, P. Protein sequence determination. Needleman, S,B., (ed), Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1970, P. 211.

3 Peterson, J. D., Nehrlich, S., Oyer, P. E., and Steiner, D. F., Determination of the amino acid sequence of the Monkey, Sheep, and Dog proinsulin C-Peptides by a semi micro Edman degradation procedure. *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 4866.

4 Bridgen, J., Craffeo, Karger, B.L., and Waterfield, M., The identification of PTH-amino acid. Instrumentation in amino acid sequence analysis. Academic Press, London.1975, P. 111—146.

THE AMINO ACID COMPOSITION AND THE N-TERMINAL PARTIAL SEQUENCE OF THE TOXIC PHOSPHOLIPASE A OF *VIPERA RUSSELLI SIAMENSIS* VENOM (FROM FUJIAN PROVINCE)

Tu Guang-chou Ran Yong-lu
(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Zhang Yao-shi Chen Yuan-Chung
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

Liu Kwang-fen
(Department of Pharmacology, Fujian Medical University)

ABSTRACT

The toxic phospholipase A of *Vipera russelli siamensis* venom is composed of 124 residues from 18 kinds of amino acids and has a molecular weight of 13,883 daltons. It high contents of aspartic acid (17), half-cystine (12), glycine (14) and tyrosine (9). The contents of methionine and tryptophan in this enzyme is comparatively low. The sequence of the first 22 N-terminal residues is as follows:Asn-Leu-Phe-Gln-Phe-Ala-Arg-Met-Ile-Asn-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Phe-(—)-Phe-(—)-Asn-Tyr-Ile.